(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 7 月 5 日 (05.07.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/090978 A1

(51) 国際特許分類：
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2011/080151

(22) 国際出願日： 2011 年 12 月 27 日 (27.12.2011)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2010-293972 2010 年 12 月 28 日 (28.12.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について)：公益財団法人地球環境産業技術研究機構 (RESEARCH INSTITUTE OF INNOVATIVE TECHNOLOGY FOR THE EARTH) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台 9 丁目 2 番地 Kyoto (JP). 住友ゴム工業株式会社 (SUMITOMO RUBBER INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6510072 兵庫県神戸市中央区脇浜町 3 丁目 6 番 9 号 Hyogo (JP).

(72) 発明者；および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)：湯川 英明 (YUKAWA, HideaH) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台 9 丁目 2 番地 公益財団法人地球環境産業技術研究機構内 Kyoto (JP). 乾 将行 (INUI, Masayuki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台 9 丁目 2 番地 公益財団法人地球環境産業技術研究機構内 Kyoto (JP).

(74) 代理人：岩谷 龍 (IWATANI, Ryo)；〒5300003 大阪府大阪市北区堂島 2 丁目 1 番 31 号 京阪堂島ビル 3 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, YL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
– 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
– 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(1) 及び 48.2(a)(viii))
– 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

A1 WO 2012/090978

(54) Title: TRANSFORMANT OF CORYNEFORM BACTERIUM, AND METHOD FOR PRODUCING ANILINE USING SAME

(54) 発明の名称：コリネ型細菌形質転換体及びそれを用いるアニリンの製造方法

(57) Abstract: A transformant which is produced by introducing a gene encoding an enzyme having an aminobenzoate decarboxylase activity into a host coryneform bacterium and which is capable of producing aniline; and a method for producing aniline, comprising a step of reacting the transformant in a reaction solution containing aminobenzoic acid, an ester thereof and/or a salt thereof under reductive conditions and a step of collecting aniline fixim a reaction culture medium.

(57) 要約：アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ (aminobenzoate decarboxylase) 活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、アニリン生産能を有する形質転換体。この形質転換体を、還元条件下、アミノ安息香酸、そのエステル、及びノ又はその塩を含有する反応液中で反応させるエ程と、反応培地中のアニリンを回収する工程とを含むアニリンの製造方法。

明　細　書

発明の名称　：

コリネ型細菌形質転換体及びそれを用いるアニリンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、アニリン生産技術に関する。さらに詳しくは、アニリン生産機能を付与するために特定の遺伝子操作が施されたコリネ型細菌の形質転換体、及びこの形質転換体を用いた効率的なアニリンの製造技術に関する。

背景技術

[0002] 地球温暖化、及び化石資源枯渇問題を背景に、再生可能資源を原料とした化学品の製造は、バイオ燃料製造と並び、新産業バイオリファイナリーとして低炭素社会実現の重要な方策であることが認識され、大きな注目が集まっている。

ここで、アニリンは、染料、タイヤの加硫促進剤や老化防止剤等のゴム製品材料のような化学製品 ;繊維、導電性ポリマーのような機能材料 ;農薬 ;医薬品などの原料として広く利用されている。

[0003] 現在、アニリンは、原油を原料として化学的に生産されている。化学的アニリン製造方法としては、ニトロベンゼンをスズまたは鉄と塩酸で還元する方法、銅、ニッケルなどの金属触媒を用いてニトロベンゼンに水素添加する還元法、高温高圧下にクロロベンゼンとアンモニアとを反応させる方法 (アンモノリシス)などがあるが、いずれも溶剤類及び高熱エネルギーを必要とする、典型的な化学工業の高エネルギー消費型プロセスである。従って、地球環境保全や温室効果ガス削減の観点から、二酸化炭素排出が少ない省エネルギー型で、再生可能資源から製造でき、低廃棄物排出の環境調和型プロセスの開発、即ちバイオアニリン製造技術確立が急務となっている。

しかし、再生可能資源を原料としたバイオアニリン生産は、乳酸やエタノールの生産と比較して、原料となる糖類からの代謝反応段数が非常に多いために生産性が低い。また、生産物であるアニリンによる菌の増殖阻害や、ア

ニリンによる細胞毒性等の難点がある。このため、工業的生産は不可能とされている。

[0004] 非遺伝子組換え菌によるアニリン生成技術として、具体的には、以下の方法が知られている。

例えば、非特許文献1は、マイコバクテリウム スメグマティス(Mycobacterium smegmatis)を培養した後、洗菌した細胞に4-アミノ安息香酸を添加すると、微量のアニリンが生成することを開示している。しかし、非特許文献1の方法はアニリン生産性が実用上十分ではない。なお、非特許文献1は、4-アミノ安息香酸からのアニリン生成に関わる酵素、その活性、及び活性を有する酵素遺伝子には言及していない。

また、非特許文献2は、病原性大腸菌エシエリキア コリ(Escherichia coli) 0111の洗菌した細胞、又は細胞抽出液に、アントラニル酸(2-アミノ安息香酸)、又は4-アミノ安息香酸を添加すると、微量のアニリンが生成することを開示している。しかし、非特許文献2の方法はアニリン生産性が実用上十分ではない。なお、非特許文献2は、アントラニル酸、又は4-アミノ安息香酸からのアニリン生成に関わる酵素、その活性、及び活性を有する酵素遺伝子には言及していない。

また、特許文献1は、ストレプトマイセス グリセウス(Streptomyces griseus)を、アニリン原料としてグルコースを含むTSB (Trypticase Soy Broth)培地で、好気条件下に4~5日間培養することにより、培養液中にアニリンを生成させる技術を開示している。しかし、特許文献1には、具体的なアニリンの生産量や、生産効率などが示されておらず、特許文献1の方法の実用性については不明である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1:特開2008-274225号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1:The Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, 1951, 453-

458.

非特許文献2：Journal of the American Chemical Society, Vol. 79, 1957, 628-630.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、アミノ安息香酸を原料として効率よくアニリンを製造できる微生物、及びアミノ安息香酸を原料として効率よくアニリンを製造できる方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するために本発明者らは研究を重ね、コリネ型細菌にアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ(aminobenzoate decarboxylase)遺伝子を導入した形質転換体は、効率よくアミノ安息香酸からアニリンを生産することを見出した。また、この形質転換体は、還元条件下の反応液中で実質的に増殖しない状態で反応させる場合、特に、アニリン生産効率が高いことを見出した。

[0009] 本発明は上記知見に基づき完成されたものであり、以下の形質転換体及びアニリンの製造方法を提供する。

項1. アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ(aminobenzoate decarboxylase)活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、アニリン生産能を有する形質転換体。

項2. アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が、バチラス サプチリス(Bacillus subtilis)由来の遺伝子、ラクトバチルス ラムノーサス(Lactobacillus rhamnosus)由来の遺伝子、ラクトバチラス プレビス(Lactobacillus brevis)由来の遺伝子、シュードモナス プチダ(Pseudomonas putida)由来の遺伝子、エシエリキア コリ(Escherichia coli)由来の遺伝子、サッカロマイセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)由来の遺伝子、又はエンテロバクター クロアカエ(Enterobacter cloacae)由来の遺伝子である項1に記載の形質転換体。

項３．　アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が下記の(a)又は(b)のDNAである項１に記載の形質転換体。

(a)　配列番号16の塩基配列からなるDNA、配列番号19の塩基配列からなるDNA、配列番号22の塩基配列からなるDNA、配列番号25の塩基配列からなるDNA、配列番号28の塩基配列からなるDNA、配列番号31の塩基配列からなるDNA、又は配列番号34の塩基配列からなるDNA

(b)　(a)の何れかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

項４．　宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム ダルタミカムである項１～３の何れかに記載の形質転換体。

項５．　宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルミカムR (FERM P— 18976) 、ATCC 13032, 又はATCC1 3869 である項４に記載の形質転換体。

項６．　コリネバクテリウム グルタミカム ANI-1 (受託番号 :NITE BP-1 001) 形質転換体。

項７．　項１～６の何れかに記載の形質転換体を、還元条件下、アミノ安息香酸、そのエステル、及び/ 又はその塩を含有する反応液中で反応させる工程と、反応培地中のアニリンを回収する工程とを含むアニリンの製造方法。

項８．　反応工程において、形質転換体が実質的に増殖しない項７に記載のアニリンの製造方法。

項９．　還元条件下の反応液の酸化還元電位が—２００～－５００ミリボルトである項７又は８に記載のアニリンの製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明の形質転換体を用いることにより、アミノ安息香酸、その塩、又はそのエステルからアニリンを高効率で製造することができる。

一般に微生物はアニリンのような溶剤の細胞毒性により生育が阻害されるため、微生物を用いてアニリンを製造することは困難であつたが、本発明方

法によれば、微生物を用いて、実用上十分に効率良くアニリンを製造することができる。

図面の簡単な説明

[00 11] [図1]実施例で用いたプラスミドの構成を示す図である。

発明を実施するための形態

[00 12] 以下、本発明を詳細に説明する。

(I) アニリン生産能を有する形質転換体

本発明のアニリン生産能を有する形質転換体は、アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された形質転換体である。

[00 13] 宿主

コリネ型細菌とは、バージーズ・マニュアル・デターミネィティブ・バクテリオロジー [Bergeys Manual of Determinative Bacteriology、Vol. 8、599 (1974)] に定義されている一群の微生物であり、通常の好気的条件で増殖するものならば特に限定されるものではない。具体例を挙げれば、コリネバクテリウム属菌、プレビバクテリウム属菌、アースロバクター属菌、マイコバクテリウム属菌、マイクロコッカス属菌等が挙げられる。コリネ型細菌の中ではコリネバクテリウム属菌が好ましい。

[00 14] コリネバクテリウム属菌としては、コリネバクテリウム ダルタミカム、コリネバクテリウム エフィシエンス (Corynebacterium efficiens)、コリネバクテリウム アンモニアゲネス (Corynebacterium ammoniagenes)、コリネバクテリウム ハロトレランス (Corynebacterium halotolerance)、コリネバクテリウム アルカノリティカム (Corynebacterium alkanolyticum) 等が挙げられる。

中でも、安全でかつアニリン生産性が高い点で、コリネバクテリウム グルタミカムが好ましい。好適な菌株として、コリネバクテリウム ダルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R株 (FERM P-18976)、ATCC 13032 株、ATCC 13869 株、ATCC 13058 株、ATCC 13059 株、ATCC 13060 株、ATCC 13232 株、ATCC 1

3286 株、ATCC 13287 株、ATCC 13655 株、ATCC 13745 株、ATCC 13746 株、ATCC 1376 1 株、ATCC 14020 株、ATCC3 1831株、MJ-233 (FERM BP- 1497) 、MJ-233AB-41 (FERM BP- 1498) 等が挙げられる。中でも、R株 (FERM P- 18976) 、ATCC 13032 株、ATCC 13869 株が好ましい。

[00 15] なお、分子生物学的分類により、プレビバクテリゥム フラバム (Brevibacterium f Lavum) 、プレビバクテリウム ラクトファーメンタム (Brevibac terium Lactofermen tum) 、プレビバクテリクム ディバリカタム (Brevibac terium divaricat um) 、コリネバクテリウム リリゥム (Corynebac terium LiLium) 等のコリネ型細菌もコリネバクテリゥム グルタミカム (Corynebac terium g LutaMicum) と菌名が統一されている〔Lieb L, W. et a L., Transfe r of Brevibac terium divaricat um DSM 20297T, "Brevibac terium f Lavum" DSM 2041 1, "Brevibac terium Lactofermen tum" DSM 2041 2 and DSM 14 12, and Coryne bac terium g Lutamicum and their distinction by rRNA gene restriction p atterns. Int J Sys t Bac terio L. 4 1:255-260. (1991)、駒形和男ら,コリネフォルム細菌の分類,発酵と工業,45:944-963 (1987) 〕。

旧分類のプレビバクテリゥム ラクトファーメンタムATCC 13869 株、プレビバクテリゥム フラバムのMJ-233 株 (FERM BP- 1497) 、MJ-233AB-41 株 (FERM BP- 1498) なども好適なコリネバクテリゥム ダルタミカムである。

プレビバクテリウム属菌としては、プレビバクテリゥム アンモニアゲネス (Brevibac terium ammon iagenes) (例えばATCC6872 株) 等が挙げられる。

[00 16] アースロバクター属菌としては、アースロバクター グロビフオルミス (Arthrobac ter g Lobiformis) (例えばATCC80 10株、ATCC4336 株、ATCC2 1056 株、ATCC3 1250 株、ATCC3 1738 株、ATCC35698 株) 等が挙げられる。

マイコバクテリウム属菌としては、マイコバクテリゥム ボビス (Mycobacterium bov is) (例えばATCC 19210株、ATCC27289 株) 等が挙げられる。

マイクロコッカス属菌としては、マイクロコッカス フロイデンライヒ (Micrococcus freuden reichii) (例えばNo. 239 株 (FERM P- 1322 1)) 、マイクロコッカス ルテウス (Micrococcus Leut eus) (例えばNo. 240 株 (FERM P

- 13222))、マイクロコッカス ウレアエ (Micrococcus ureae) (例えばIAM1010株)、マイクロコッカス ロゼウス (Micrococcus roseus) (例えばIF03764株)等が挙げられる。

[0017] また、コリネ型細菌は、野生株の他に、その変異株や人為的な遺伝子組換え体であってもよい。例えば、ラクテート(乳酸)デヒドロゲナーゼ (Lactate dehydrogenase :LDH)、フォスフオエノールピルベートカルボキシラーゼ (phosphoeno Lpyrvate carboxy lase)、マレートデヒドロケナーセ (ma Late dehydrogenase) などの遺伝子の破壊株が挙げられる。このような遺伝子破壊株を宿主として用いることにより、アニリンの生産性を向上させたり、副生成物の生成を抑制したりすることができる。

中でも、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株が好ましい。この遺伝子破壊株は、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されていることにより、ピルビン酸から乳酸への代謝経路が遮断されている。中でも、コリネバクテリウム ダルタミカムの、特にR (FERM P-1 8976) 株のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株が好ましい。

このような遺伝子破壊株は、遺伝子工学的手法により常法に従い作製できる。例えば、WO2005/01 0182A1に、乳酸デヒドロゲナーゼ破壊株、及びその作製方法が記載されている。

コリネ型細菌は、他細菌に比べて、アニリンのような溶剤に対する耐性が高い。また、コリネ型細菌は、他の好気性細菌に比べて、実質的に増殖しない還元条件下で効率よく物質生産を行える。これらの点で、コリネ型細菌は本発明方法によるアニリン製造に好適である。

[0018] アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ酵素遺伝子

アミノベンゾエートデカルボキシラーゼは、アミノ安息香酸から炭酸を脱離させてアニリンを生成する反応、及びその逆反応を触媒する酵素である。

アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子の由来は特に限定されないが、バチラス サプチリス (Bacillus subtilis) 由来の遺伝子、ラクトバチルス ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus

) 由来の遺伝子、ラクトバチラス プレビス (Lactobac はLus brevis) 由来の遺伝子、シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida) 由来の遺伝子、エシエリキア コリ (Escherichia coli) 由来の遺伝子、サッカロマイセス セレピシエ (Saccha romyces cerevisiae) 由来の遺伝子、又はエンテロバクター クロアカエ (Enterobac ter cloacae) 由来の遺伝子が好ましい。中でも、バチラス サプチリス由来の遺伝子、及びエンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子が好ましい。特に、アントラニル酸 (2-アミノ安息香酸) を基質とした場合はバチラス サプチリス由来の遺伝子が好ましく、4-アミノ安息香酸を基質とした場合はエンテロバクター クロアカエ由来の遺伝子が好ましい。

[00 19] バチラス サプチリス由来の遺伝子としては配列番号16の塩基配列からなるDNAが挙げられ、ラクトバチルス ラムノーサス由来の遺伝子としては配列番号19の塩基配列からなるDNAが挙げられ、ラクトバチラス プレビス由来の遺伝子としては配列番号22の塩基配列からなるDNAが挙げられ、シュードモナス プチダ由来の遺伝子としては配列番号25の塩基配列からなるDNAが挙げられ、エシエリキア コリ由来の遺伝子としては配列番号28の塩基配列からなるDNAが挙げられ、サッカロマイセス セレピシエ由来の遺伝子としては配列番号31の塩基配列からなるDNAが挙げられ、エンテロバクター クロアカエ由来遺伝子としては配列番号34の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

[0020] また、本発明では、配列番号16、19、22、25、28、31、又は34の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

本発明において「ストリンジェントな条件」は、一般的な条件、例えば、M 0 Lecu Lar CLoning, A Labo ratory Manua l, Second Edit ion, 1989, Vo L2, p1 1.45に記載された条件を指す。具体的には、完全ハイブリッドの融解温度 (Tm) より5~ 10℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合を指す。

[002 1] アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性は、丄 Am . Chem. Soc. , 79, 628-630 (1957) に記載の方法を改変して測定できる。簡単に説明すると、コ

リネ型細菌を栄養培地で、18時間33℃で培養したものを、最少培地で2回洗菌した後、最少培地に再懸濁、Intact Ce LLとする。次に反応として、Intact Ce LL にHEPES(pH7. 0)を緩衝液として25mM 加え、基質としてアントラニル酸、又は4-アミノベンゾエートを終濃度5mMになるように添加する。33℃、200rpm で6時間振とう後、反応液を菌と上清に遠心分離し、上清を0.22μmのフィルターで濾過したものをサンプルとする。生じたアニリン生成量をGC/MS、又はHPLCで定量できる。

また、本発明では、配列番号16、19、22、25、28、31、又は34の塩基配列と同一性が90% 以上、好ましくは95% 以上、より好ましくは98% 以上の塩基配列からなり、かつアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも使用できる。

本発明において、塩基配列の同一性は、GENETYX ver. 8 (GENETYX 株式会社ゼネティックス製)により算出した値である。

[0022] 配列番号16、19、22、25、28、31、又は34の塩基配列からなるDNAのホモログは、例えば、これらの塩基配列に基づき常法に従い設計したプライマー又はプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションにより、他生物種のDNAライブラリーから選択することができ、これにより高確率でアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが得られる。

[0023] 形質転換のためのベクターの構築

PCRで増幅したアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ酵素をコードするDNAは、それぞれ、宿主で増幅できる適切なベクターにクローニングすればよい。

プラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内で自律複製機能を司る遺伝子を含むものであれば良い。その具体例としては、プレビバクテリウム ラクトフアーメンタム (Brevibacter ium Lactof ermentum) 2256 由来のpAM330 〔特開昭58-67699〕、〔Miwa, K. et al, Cryptic pLasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol Chem. 48: 2901-2903 (1984)〕 及び 〔

Yamaguchi, R. et al., Determination of the complete nucleotide sequence of the Brevibacterium Lactofermentum plasmid pAM330 and the analysis of its genetic information. Nucleic Acids Symp. Ser. 16:265-267 (1985)〕、コリネバクテリウム ダルタミカム ATCC13058 由来のpHM1519〔MiWa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48: 2901-2903 (1984)〕及びpCRY30 [Kurusu, Y. et al., Identification of plasmid partition function in coryneform bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57:759-764 (1991)〕、コリネバクテリウム グルタミカム T250 由来のpCG4 〔特開昭57-183799〕、[Katsumata, R. et al., Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. J. Bacteriol. 159:306-311 (1984)〕、pAG1、pAG3、pAG14、pAG50 〔特開昭62-166890〕、pEK0、pEC5、pEKExl〔Eikmanns, B.J. et al., A family of Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing國 Gene, 102: 93-98 (1991)〕などが挙げられる。

[0024] 好ましいプロモーターとしては、コリネバクテリウム グルタミカムR由来のグリセルアルデヒド3-フォスフェートデヒドロゲナーゼA遺伝子(gapA)のプロモーターPgapA、マレートデヒドロゲナーゼ遺伝子(mdh)のプロモーターPmdh、ラクテートデヒドロゲナーゼA遺伝子(LdhA)のプロモーターPLdhAなどが挙げられ、中でも、PgapAが好ましい。

好ましいターミネーターとしては、大腸菌rRNAオペロンのrrnB T1T2 ターミネーター、大腸菌のtrpA ターミネーター、プレビバクテリウム ラクトファーメンタム (Brevibacterium Lactofermentum) のtrp ターミネーターなどが挙げられ、中でも、rrnB T1T2 ターミネーターが好ましい。

[0025] 形質転換

形質転換方法は、公知の方法を制限無く使用できる。このような公知の方法として、例えば塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、リン酸カルシウム法、DEAE—デキストラン介在トランスフエクシヨン、電気穿孔法などが挙

げられる。中でも、コリネ型細菌には、電気パルス法が好適であり、電気パルス法は、公知の方法 [Kurusu, Y. et aL., ELect roporat ion-t ransformat ion system for Corynef orm bacter ia by auxot roph ic comp Lementat ion. Ag ric. Biol Chem. 54:443-447 (1990)] 及び 〔Vertes A.A. et aL, Pre sence of mrr- and mcr- Like rest rict ion systems in Corynef orm bacter ia . Res. Microb iol. 144: 181-185 (1993) 〕により行うことができる。

[0026] 形質転換体は、微生物の培養に通常使用される培地を用いて培養すればよい。この培地としては、通常、炭素源、窒素源、無機塩類及びその他の栄養物質等を含有する天然培地又は合成培地等を用いることができる。

炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、マンノース、マルトース、マンニトール、キシロース、アラビノース、ガラクトース、澱粉、糖蜜、ソルビトール、グリセリン等の糖質又は糖アルコール;酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸又はダルコン酸等の有機酸;エタノール、プロパノール等のアルコール等が挙げられる。また、所望によりノルマルパラフィン等の炭化水素等も用いることができる。炭素源は、1種を単独で使用でき、又は2種以上を混合して使用してもよい。培地中のこれら炭素源の濃度は、通常、約0.1~10 (w/ v %) とすればよい。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機又は有機アンモニウム化合物、尿素、アンモニア水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等が挙げられる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ—アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。培地中の窒素源濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~10 (w/ v %) とすればよい。

無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、又は炭酸カルシウム等が挙げられる。これら無機塩は、1種

を単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。培地中の無機塩類濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~1(w/v%)とすればよい。

栄養物質としては、例えば肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスティープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、又は動植物若しくは微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の培地濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常、約0.1~10(w/v%)とすればよい。さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、例えば、ビオチン、チアミン(ビタミンB1)、ピリドキシン(ビタミンB6)、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

培地のpHは約5~8が好ましい。

[0027] 好ましい微生物培養培地としては、A培地〔Inui, M. et al., Metabolic analysis of Corynebacterium glutamicum during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol Microbiol. Biotechnol 7:182-196 (2004)〕、BT培地[Omumasaba, C.A. et al, Corynebacterium glutamicum glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)〕等が挙げられる。

培養温度は約15~45℃とすればよく、培養時間は約1~7日間とすればよい。

[0028] (III)アニリンの製造方法

上記説明した本発明の形質転換体を、アミノ安息香酸、その塩、及び/又はそのエステルを含有する反応液中で反応させる工程と、反応液中のアニリンを回収する工程とを含む方法によりアニリンを製造することができる。

㈱まゆのほ殖

反応に先立ち、形質転換体を好気条件下で、温度約25~35℃で、約12~48時間培養して増殖させることが好ましい。

[0029] 培善用培地

反応に先立つ形質転換体の好気的培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機塩類およびその他の栄養物質等を含有する天然培地または合成培地を用いることができる。

炭素源として、糖類 (グルコース、フルクトース、マンノース、キシロース、ァラビノース、ガラクトースのような単糖 ;スクロース、マルトース、ラクトース、セロビオース、キシロビオース、トレハロースのような二糖 ;澱粉のような多糖 ;糖蜜等)、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、グリセリンのような糖アルコール ;酢酸、クェン酵、乳酸、フマル酸、マレイン酸、ダルコン酸のような有機酸 ;エタノール、プロパノールのようなアルコール ;ノルマルパラフィンのような炭化水素等も用いることができる。

炭素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。

[0030] 窒素源としては、塩化アンモニゥム、硫酸アンモニゥム、硝酸アンモニゥム、酢酸アンモニゥムのような無機又は有機アンモニゥム化合物、尿素、アンモニァ水、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等を使用できる。また、コーンスティープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ—アミン、蛋白質加水分解物、アミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用できる。窒素源は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。窒素源の培地中の濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常、約0.1~ 10 (w/ v %) とすればよし。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシゥム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等が挙げられる。無機塩は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。無機塩類の培地中の濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常、約0.01~ 1 (w/v%) とすればよい。

[0031] 栄養物質としては、肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンスティープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物、動植物又は微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の

培地中の濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常約0.1~10（w/v%）とすればよい。

さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、ビオチン、チアミン（ビタミンB1）、ピリドキシン（ビタミンB6）、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

培地のpHは約6~8が好ましい。

[0032] 具体的な好ましいコリネ型細菌用培地としては、A培地〔Inui, M. et al., Metabolic analysis of Corynebacterium glutamicum during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)〕、BT培地 [Omumasaba, C.A. et al., Corynebacterium glutamicum glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)〕等が挙げられる。これらの培地において、糖類濃度を上記範囲にして用いればよい。

[0033] ほ碰

反応液は、アニリン前駆体（アニリン原料）を含有する水、緩衝液、無機塩培地などを用いることができる。

前駆体としては、アミノ安息香酸、その塩、及び/又はそのエステルを用いることができる。アミノ安息香酸としては、2-アミノ安息香酸（o-アミノ安息香酸；アントラニル酸）、3-アミノ安息香酸（m-アミノ安息香酸）、4-アミノ安息香酸（p-アミノ安息香酸）の何れも使用できる。中でも、水溶性であるため反応に使用し易い点で、2-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸が好ましい。

塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などが挙げられる。また、エステルとしては、炭素数1~4のアルコールとのエステルなどが挙げられる。

反応液への溶解度が高くなる点で、塩が好ましい。前駆体は、1種を単独で、又は2種以上を混合して使用できる。

反応液中のアミノ安息香酸、その塩、及び/又はそのエステルの濃度は、約0.1~10 (w/v%) が好ましく、約0.5~7 (w/v%) がより好ましく、約0.5~5 (w/v%) がさらにより好ましい。上記範囲であれば、効率良く、アニリンを製造できる。

緩衝液としては、リン酸バッファー、トリスバファー、炭酸バッファーなどが挙げられる。緩衝液の濃度は、約10~150 mMが好ましい。

無機塩培地としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、炭酸カルシウム等の無機塩の1種又は2種以上を含む培地が挙げられる。中でも、硫酸マグネシウムを含む培地が好ましい。無機塩培地として、具体的には、BT±¾±fe [Omumasaba, C.A. et aL., Corynebacter ium g Lutamicum g Lycera Ldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms With opposite, ATP-dependent regulation. J. MoL. Microb iol. Biotechno L. 8:91-103 (2004)〕等が挙げられる。無機塩類の培地中の濃度は、使用する無機塩によつても異なるが、通常、約0.01~1 (w/ v%) とすればよい。

反応液のPHは約6~8 が好ましい。反応中は、アンモニア水溶液、水酸化ナトリウム水溶液などを用いて、pHコントローラー (例えば、エイプル株式会社製、型式 :DT-1023) で、反応液のpHを中性付近、特に約7にコントロールしながら反応させることが好ましい。

反ま条件

反応温度、即ち反応中の形質転換体の生存温度は、約20~40 ℃が好ましく、約25~35 ℃がより好ましい。上記温度範囲であれば、効率良くアニリンを製造できる。

また、反応時間は、約1~7日間が好ましく、約1~3日間がより好ましい。

培養は、バッチ式、流加式、連続式の何れでもよい。中でも、バッチ式が好ましい。

[0034] <還元条件>

反応は、好気的条件で行ってもよく、還元条件で行ってもよいが、還元条

件で行うことが好ましい。還元条件では、コリネ型細菌は実質的に増殖せず、一層効率的にァニリンを生産させることができる。

還元条件は、反応液の酸化還元電位で規定される。反応液の酸化還元電位は、約－200 mV~ -500 mVが好ましく、約－250 mV~ -500 mVがより好ましい。

反応液の還元状態は簡便にはレサズリン指示薬(還元状態であれば、青色から無色への脱色)で推定できるが、正確には酸化還元電位差計(例えば、BROADLEY JAMES社製、ORP Elect rodes)を用いて測定できる。

[0035] 還元条件にある反応液の調整方法は、公知の方法を制限なく使用できる。例えば、反応液調製用の液体媒体として、蒸留水などの代わりに反応液用水溶液を使用してもよく、反応液用水溶液の調整方法は、例えば硫酸還元微生物などの絶対嫌気性微生物用の培養液調整方法(Pfennig, N. et aL. (1981):The dissimi Latory suLfate-reduc ing bacter ia, In The Prokaryotes, A Handbook on Hab i tats, Iso Lat ion and Ident if icat ion of Bacter ia, Ed. By Star r, M. P. et aし p926-940, Ber l in, Spr inger Ver Lag.)や「農芸化学実験書 第三巻、京都大学農学部 農芸化学教室編、1990年第26刷、産業図書株式会社出版」などが参考となり、所望する還元条件下の水溶液を得ることができる。

具体的には、蒸留水などを加熱処理や減圧処理して溶解ガスを除去することにより、還元条件の反応液用水溶液を得ることができる。この場合、約10 mmHg以下、好ましくは約5 mmHg以下、より好ましくは約3 mmHg以下の減圧下で、約1~60分程度、好ましくは約5~40分程度、蒸留水などを処理することにより、溶解ガス、特に溶解酸素を除去して還元条件下の反応液用水溶液を作成することができる。

また、適当な還元剤(例えば、チオグリコール酸、ァスコルビン酸、システィン塩酸塩、メルカプト酢酸、チオール酢酸、ダルタチオン、硫化ソーダ等)を添加して還元条件の反応液用水溶液を調整することもできる。

これらの方法を適宜組み合わせることも有効な還元条件の反応液用水溶液

の調整方法である。

[0036] 反応中も反応液を還元条件に維持することが好ましい。反応途中での還元条件を維持するために、反応系外からの酸素の混入を可能な限り防止することが望ましく、具体的には、反応系を窒素ガス等の不活性ガスや炭酸ガス等で封入する方法が挙げられる。酸素混入をより効果的に防止する方法としては、反応途中において本発明の好気性細菌の菌体内の代謝機能を効率よく機能させるために、反応系のｐＨ維持調整液の添加や各種栄養素溶解液を適宜添加する必要が生じる場合もあるが、このような場合には添加溶液から酸素を予め除去しておくことが有効である。

[0037] アニリンの回収

上記のようにして培養することにより、反応液中にアニリンが生産される。反応液を回収することによりアニリンを回収できるが、さらに、公知の方法でアニリンを反応液から分離することもできる。そのような公知の方法として、蒸留法、膜透過法、有機溶媒抽出法等が挙げられる。

実施例

[0038] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 アニリン生産遺伝子のクローニングと発現

(1) 微生物からの染色体DNAの抽出

バチルス サプチリス (Bac iLLus subt iLis) NBRC 14144からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No. 802培地 [po Lypeptone 10 g, yeast ext ract 2 g, Mg $S0_4$ - $7H_20$ 1 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名 :Genom ic Prep CeLLs and Tissue DNA Iso lat ion Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0039] ラクトバチルス ラムノーサス (Lactobac はLus rhamnosus) NBRC 3425からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No. 804培地 [po Lypeptone 5 g, yeast ext ract 5 g, glucose 5 g, $MgS0_4$ - $7H_20$ 1 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を

用いて植菌後、対数増殖期まで30℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0040] ラクトバチラス プレビス (Lactobacillus brevis) ATCC 367からの染色体DNA抽出は、Lactobacilli MRS broth (ベクトン・ディッキンソン社製 BD 288130)に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで30℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0041] シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida KT2440) ATCC 47054からの染色体DNA抽出は、LB培地 [tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 gを蒸留水1 Lに溶解]に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0042] エシェリキア コリ (Escherichia coli K-12 MG1655) からの染色体DNA抽出は、LB培地 [tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 gを蒸留水1 Lに溶解]に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0043] サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) NBRC 10217からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No. 108培地 [glucose 10 g, peptone 5 g, yeast extract 3 g, maLt extract 3 gを蒸留水1 Lに溶解]に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで24℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名:GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回

収した。

[0044] エンテロバクター クロアカエ (Enterobacter cloacae) NBRC 13535 からの染色体DNA抽出は、NBRC Medium No. 802 培地 [poLypept one 10 g, yeast extract 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 gを蒸留水1 Lに溶解] に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37℃で振盪培養し、菌体を集菌後、DNAゲノム抽出キット(商品名 :GenomicPrep CeLLs and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製)を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0045] (2) クローニングベクターの構築

クローニングベクターPCRB22 の構築

コリネバクテリウム カゼイ JCM 12072 由来のプラスミドpCASE IのDNA複製起点 (以降、pCASE 1-oriと記す)配列、及びクローニングベクターpHSG298 (タカラバイオ株式会社製)をそれぞれ含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、pCASE 1-ori配列、クローニングベクターpHSG298 をそれぞれクローン化するべく、配列番号1 (pCASE 1-ori配列)、配列番号2 (クローニングベクター pHSG298) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0046] pCASE 1-ori配列増幅用プライマー

(a-1) ; 5'-AT AGATCT AGAACGTCCGTAGGAGC -3' (配列番号3)

(b-1) ; 5'-AT AGATCT GACTTGGTTACGATGGAC -3' (配列番号4)

尚、プライマー (a-1) 及び (b-1) には、BgLII制限酵素部位が付加されている。

クローニングベクターPHSG298 増幅用プライマー

(a-2) ; 5'-AT AGATCT AGGTTTCCCGACTGGAAAG -3' (配列番号5)

(b-2) ; 5'-AT AGATCT CGTGCCAGCTGCATTAATGA -3' (配列番号6)

尚、プライマー (a-2) 及び (b-2) には、BgLII制限酵素部位が付加されている。

[0047] 鋳型DNAは、Japan. CoLLection of Microorganisms (JCM) より入手したコ

リネバクテリゥム　カゼィ JCM 12072 から抽出したトータルDNA及びクローニングベクターPHSG298 (タカラバイオ株式会社製) を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバィオ株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0048] 反応液 :

TaKaRa LA Taq™ (5 units/ μl)	0.5μl	
10X LA PCR™ Buffer II (Mg2+ free)	5 μl	
25mM $MgCl_2$	5 μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl	
鋳型 DNA	5μl	(DNA 含有量 1μg 以下)
上記記載の 2 種プライマーり	各々0.5μl	(最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5 μl	

以上を混合し、この 50 μl の反応液を PCR にかけた。

*) pGASE1-ori 配列を増幅する場合はプライマー (a-1) と (b-1) の組み合わせ、クローニングベクターPHSG298 を増幅する場合はプライマー (a-2) と (b-2) の組み合わせで行った。

[0049] PCR サイクル :

デナチユレーシヨン過程	:94℃	60 秒
アニーリング過程	:52℃	60 秒
エクステンション過程	:72℃	
	pCASE1-ori 配列	150 秒
	クローニングベクターPHSG298	180 秒

以上を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。

上記で生成した反応液10μLを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、pCASE 1-ori配列の場合約1.4-kb 、クローニングベクターpHSG298 の場合、約2.7-kb のDNA断片が検出できた。

[0050] 上記のPCRにより増幅したコリネバクテリゥム　カゼィ株由来のプラスミドpCASE 1-ori配列含む約1.4-kb DNA断片10μL及びクローニングベクタ- pHSG298を含む約2.7-kb DNA断片10μlを各々制限酵素Bg LIIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNA リガーゼ10X 緩衝液 1μl 、T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1

unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションA液とした。

得られたライゲーションA液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素BglIIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターPHSG298 約2.7-kb のDNA断片に加え、pCASE-ori配列の約1.4-kb DNA断片が認められた。

pCASE1-ori配列を含むクローニングベクターをpCRB22と命名した。

[0051] クローニングベクターpCRB207の構築

コリネバクテリウム ダルタミカムR由来のダリセルアルデヒド3リン酸デヒドロケナーゼ(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)をコードするgapA遺伝子のプロモーター配列(以降、PgapAと記す)を含むDNA断片、及びクローニングベクターPKK223-3(ファルマシア社製)由来rrnBT1T2双方向ターミネーター配列(以降、ターミネーター配列と記す)を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、PgapA配列及びターミネーター配列をそれぞれクローン化するべく、配列番号7(PgapA配列)、配列番号8(ターミネーター配列)を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0052] PgapA配列増幅用プライマー

(a-3) ; 5'-CTCT GTCGAC CCGAAGATCTGAAGATTCCTG-3' (配列番号9)

(b-3) ; 5'-CTCT GTCGAC GGATCC CCATGG TGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG-3' (配列番号10)

尚、プライマー(a-3)には、SalI制限酵素部位が、プライマー(b-3)には、SalI、BamHI及びNcoI制限酵素部位が付加されている。

ターミネーター配列増幅用プライマー

(a-4) ; 5' - CTCT GCATGC CCATGG CTGTTTTGGCGGATGAGAGA -3'

(配列番号11)

(b-4) ; 5' - CTCT GCATGC TCATGA AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGG -3

(配列番号12)

尚、プライマー (a-4) には、SphI及びNcoI制限酵素部位が、プライマー (b-4) には、SphI及びBspHI制限酵素部位が付加されている。

[0053] 鋳型DNAは、コリネバクテリウム ダルタミカム R (FERM P-18976) から抽出した染色体DNA及びPKK223-3プラスミド (ファルマシア社製) を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバイオ株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0054] 反応液 :

TaKaRa LA Taq™ (5 units/μl)	0.5μl	
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl	
25mM $MgCl_2$	5μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl	
鋳型 DNA	5μl	(DNA含有量 1ng以下)
上記記載の2種プライマー	各々0.5μl	(最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl	

以上を混合し、この50μlの反応液をPCRにかけた。

*) PgapA配列を増幅する場合はプライマー(a-7)と(b-7)の組み合わせ、ターミネーター配列を増幅する場合はプライマー(a-8)と(b-8)の組み合わせで行った。

[0055] PCRサイクル :

デナチュレーション過程	: 94℃	60秒
アニーリング過程	: 52℃	60秒
エクステンション過程	: 72℃	
	PgapA配列	45秒
	ターミネーター配列	30秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

上記で生成した反応液10μLを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、PgapA配列の場合約0.6-kb、ターミネーター配列の場合、約0.4-kbのDNA断片

が検出できた。

[0056] 上記のPCRにより増幅したコリネバクテリウム ダルタミカム R由来PgapA配列を含む約0.6-kb DNA断片10μlとクローニングベクターpCRB22約4.1-kbを各々制限酵素SalIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1从し T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションB液とした。

得られたライゲーションB液を、塩化カルシウム法〔Journa L of Mo Lecu Lar Bio Logy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素SalIでそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターpCRB22約4.1-kbのDNA断片に加え、PgapA配列)の約0.6-kb DNA断片が認められた。

PgapA配列を含むクローニングベクターをpCRB206と命名した。

[0057] 上記PCRにより増幅したPKK223-3プラスミド由来ターミネーター配列を含む約0.4-kb DNA断片10μlを制限酵素NcoI及びBspHIで、上述のクローニングベクターPCRB206 2μLを制限酵素NcoIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1μl、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μlにして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションC液とした。

得られたライゲーションC液を、塩化カルシウム法〔Journa L of Mo Lecu Lar Bio Logy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、クローニングベクターPCRB206 約4.7-kb のDNA断片に加え、ターミネーター配列の約0.4-kb DNA断片が認められた。

rrnBT1T2ターミネーター配列を含むクローニングベクターをpCRB207 と命名した。

[0058] クローニングベクターPCRB209 の構築

コリネバクテリウム グルタミカムR由来のgapA (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A) 遺伝子のプロモーター (以降、PgapA と記す) 配列を含むDNA断片を以下の方法により増幅した。

PCRに際して、pCRB207 配列をクローン化するべく、配列番号13 (pCRB207) を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを合成し、使用した。

[0059] PCRB207 配列増幅用プライマー

(a-5) ; 5'-CTCT CATATG CTGTTTTGGCGGATGAGAG-3' (配列番号14)

(b-5) ; 5'-CTCT CATATG GTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG-3' (配列番号15)

尚、プライマー (a-5) 及び (b-5) にはNdeI制限酵素部位が付加されている。

鋳型DNAは、gapA プロモーター及びrrnBT1T2ターミネーター配列を含有するクローニングベクターPCRB207 を用いた。

実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (宝酒造株式会社製) を用いて下記の条件で行った。

[0060]

反応液 :

TaKaRa LA Taq™ (5 units/ μl)	0.5 μl	
10X LA PCR™ Buffer II (Mg2+ free)	5 μl	
25mM MgCl2	5 μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8 μl	
鋳型 DNA	5 μl	(DNA 含有量 1μg 以下)
上記記載の2種プライマー《	各々0.5 μl	(最終濃度 ま
滅菌蒸留水	25.5 μl	

以上を混合し、この 50 μl の反応液を PCR にかけた。

*) pCRB207 配列を増幅する場合はプライマー (a-9) と (b-9) の組み合わせで行った。

[0061] PCR サイクル :

デナチュレーション過程	:94℃	60 秒
アニーリング過程	:52℃	60 秒
エクステンション過程	:72℃	307 秒

以上を1サイクルとし、30 サイクル行った。

上記で生成した反応液10μLを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、クローニングベクターpCRB207 配列を含む約5.1-kb のDNA断片が検出できた。

[0062] 上記のPCRにより増幅したpCRB207 由来遺伝子を含む約5.1-kb DNA断片10μlを制限酵素NdeIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、これにT4 DNA リガーゼ10X 緩衝液 1μl 、T4 DNA リガーゼ (宝酒造株式会社製) 1 unit の各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションD液とした。

得られたライゲーションD液を、塩化カルシウム法 〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕 によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地 〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕 に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素NdeI で切断し、制限酵素サイトの挿入を確認した。

PgapA 配列及びrrnBT1T2ターミネーター配列を含むクローニングベクターを

pCRB209 と命名した。

[0063] (3) アニリン生産遺伝子のクローニング

バチラス サプチリス由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

バチラス サプチリス由来のアミノベンゾエートデカルボキシラーゼをコードするbsdBCD (以降、dec/BS と記載)遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/BS 遺伝子をクローン化するべく、配列番号16 (バチラス サプチリスdec/BS 遺伝子)を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0064] dec/BS 遺伝子増幅用プライマー

(a-6) ; 5'-CTCT CATATG AAAGCAGAATTCAAGCGTAAAG -3' (配列番号17)

(b-6) ; 5'-CTCT CATATG GATCAAGCCTTTCGTTCCG -3' (配列番号18)

尚、プライマー (a-6) 及び (b-6) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0065] ラクトバチルス ラムノーサス由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

ラクトバチルス ラムノーサス由来のアミノベンゾエートデカルボキシラーゼをコードするubiDX (以降、dec/LR と記載)遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/LR 遺伝子をクローン化するべく、配列番号19 (ラクトバチルス ラムノーサスdec/LR 遺伝子)を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0066] dec/LR 遺伝子増幅用プライマー

(a-7) ; 5'-CTCT CATATG ACAGCATCACCTTGGG -3' (配列番号20)

(b-7) ; 5'-CTCT CATATG TCATCTTAACGACGCTCCATTC -3' (配列番号21)

尚、プライマー (a-7) 及び (b-7) には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0067] ラクトバチルス_プレビス由来のァニリン生産遺伝子のクローニング

ラクトバチルス プレビス由来のァミノベンゾェートデカルボキシラーゼをコードするLVIS_1987-LVIS_1986（以降、dec/LB と記載）遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/LB 遺伝子をクローン化するべく、配列番号22（ラクトバチルス プレビスdec/LB 遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（App U ed Biosys tems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー（synthes izer）」を用いて合成し、使用した。

[0068] dec/LB 遺伝子増幅用プライマー

(a-8) ; 5' - CTCT CATATG GTAAATGATCCTTATGATTTACGAAAAG -3'

(配列番号23)

(b-8) ; 5' - CTCT CATATG CTAATCTCCCTCCCAACG -3' (配列番号24)

尚、プライマー（a-8) 及び（b-8) には、Nde I制限酵素部位が付加されている。

[0069] シュードモナス_プチダ由来のァニリン生産遺伝子のクローニング

シュードモナス プチダ由来のァミノベンゾェートデカルボキシラーゼをコードするubiD（以降、dec/PP と記載）遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/PP 遺伝子をクローン化するべく、配列番号25（シュードモナス プチダdec/PP 遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（App U ed Biosys tems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー（synthes izer）」を用いて合成し、使用した。

[0070] dec/PP 遺伝子増幅用プライマー

(a-9) ; 5' - CTCT CATATG AACGGGCCGGAAC -3' (配列番号26)

(b-9) ; 5' - CTCT CATATG TCAATCATCCACCCCGAAG -3' (配列番号27)

尚、プライマー（a-9) 及び（b-9) には、Nde I制限酵素部位が付加されている。

[007 1] エシェ¡えキア コリ由来のァニリン生産遺伝子のクローニング"

エシエリキア コリ由来のアミノベンゾエートデカルボキシラーゼをコードするpurEK（以降、dec/EC と記載）遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/EC 遺伝子をクローン化するべく、配列番号28（エシエリキア コリdec/EC 遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製「394 DNA/RNA シンセサイザー（synthesizer）」を用いて合成し、使用した。

[0072] dec/EC 遺伝子増幅用プライマー

(a-10)；5'-CTCT CATATG TCTTCCCGCAATAATCCG -3' (配列番号29)

(b-10)；5'-CTCT CATATG TTAACCGAACTTACTCTGCGC -3' (配列番号30)

尚、プライマー（a-10）及び（b-10）には、NdeI制限酵素部位が付加されている。

[0073] サッカロマイセス セレピシエ由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

サッカロマイセス セレピシエ由来のアミノベンゾエートデカルボキシラーゼをコードするADE2（以降、dec/SC と記載）遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/SC 遺伝子をクローン化するべく、配列番号31（サッカロマイセス セレピシエdec/SC 遺伝子）を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製「394 DNA/RNA シンセサイザー（synthesizer）」を用いて合成し、使用した。

[0074] dec/SC 遺伝子増幅用プライマー

(a-11)；5'-CTCT CCATGG ATTCTAGAACAGTTGGTATATTAG -3' (配列番号32)

(b-11)；5'-CTCT CCATGG TTACTTGTTTTCTAGATAAGCTTCGTAAC -3'

(配列番号33)

尚、プライマー（a-11）及び（b-11）には、NcoI制限酵素部位が付加されている。

[0075] エンテロバクター_クロアカエ由来のアニリン生産遺伝子のクローニング

エンテロバクター クロアカエ由来のアミノベンゾエートデカルボキシラ

—ゼをコードするECに04083-EC に04082-EC に0408 1 (以降、dec/ECL と記載)遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

PCRに際して、dec/ECL 遺伝子をクローン化するべく、配列番号34 (エンテロバクター クロアカエdec/ECL 遺伝子)を基に、それぞれ下記の一対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (App U ed Biosys tems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthes izer)」を用いて合成し、使用した。

dec/ECL 遺伝子増幅用プライマー

(a- 12) ; 5' - CTCT CATATG AGATTGATCGTGGGAATGAC -3' (配列番号35)

(b- 12) ; 5' - CTCT CATATG TTACAGCAATGGCGGAATGG -3' (配列番号36)

尚、プライマー (a-12) 及び (b-12) には、Nde I制限酵素部位が付加されている。

[0076] 錶型DNAは、バチラス サプチリスは、NITE BioLogicaL Resou rce Cen ter (NBRC) より入手したバチルス サプチリス NBRC 14 144から抽出した染色体DNAを用いた。ラクトバチルス ラムノーサスは、NITE BioLogicaL Resou rce Center (NBRC) より入手したラクトバチルス ラムノーサス NBRC 3425 から抽出した染色体DNAを用いた。ラクトバチルス プレビスは、Ame rican Type CuLture CoLLection (ATCC) より入手したラクトバチラス プレビス ATCC 367 から抽出した染色体DNAを用いた。シュードモナス プチダは、Ame rican Type CuLture CoLLection (ATCC) より入手したシュードモナス プチダ ATCC 4705 4から抽出した染色体DNAを用いた。エシエリキア コリは、エシエリキア コリ K- 12 MG1655 から抽出した染色体DNAを用いた。サッカロマイセス セレビシエは、NITE BioLogicaL Resou rce Cen ter (NBRC) より入手したサッカロマイセス セレピシエ NBRC 10217から抽出した染色体DNAを用いた。エンテロバクター クロアカエは、NITE BioLogicaL Resou rce Cen ter (NBRC) より入手したエンテロバクター クロアカエ NBRC 13535 から抽出した染色体DNAを用いた。

[0077] 実際のPCRは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR Sys tem 9700 (アプライド・バイオシステムズ社製)を用い、反応試薬としてTaKaRa LA Taq (タカラバ

ィ才株式会社製）を用いて下記の条件で行った。

反応液：

TaKaRa LA Taq™ (5 units/ μl)	0.5μl	
10X LA PCR™ Buffer II (Mg^{2+} free)	5μl	
25mM $MgCl_2$	5μl	
dNTP Mixture (2.5mM each)	8μl	
錶型 DNA	5μl	(DNA 含有量 1μg 以下)
上記記載の 2 種プライマー*】	各々0.5μl	(最終濃度 1μM)
滅菌蒸留水	25.5μl	

以上を混合し、この 50 μlの反応液を PCR にかけた。

*）バチラス サプチリスdec/BS 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-6）と（b-6）の組み合わせ、ラクトバチルス ラムノーサスdec/LR 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-7）と（b-7）、ラクトバチルス プレビスdec/LB 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-8）と（b-8）の組み合わせ、シュードモナス プチダdec/PP 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-9）と（b-9）の組み合わせ、エシエリキア コリdec/EC 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-10）と（b-10）の組み合わせ、サッカロマイセス セレピシエdec/SC 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-11）と（b-11）の組み合わせ、エンテロパクター クロァカエdec/ECL 遺伝子を増幅する場合はプライマー（a-12）と（b-12）の組み合わせで行った。

[0078] PCR サイクル：

デナチユレーション過程	:94℃		60 秒
アニーリング過程	:52℃		60 秒
エクステンション過程	:72℃		
バチラス サブチリス		dec/BS 遺伝子	137 秒
ラクトバチルス ラムノーサス		dec/LR 遺伝子	123 秒
ラクトバチルス ブレビス		dec/LB 遺伝子	123 秒
シユードモナス プチダ		dec/PP 遺伝子	45 秒
ェシエリキア コリ		dec/EC 遺伝子	94 秒
サッカロマイセス セレピシェ		dec/SC 遺伝子	103 秒
エンテロパクター クロァカエ		dec/ECL 遺伝子	135 秒

以上を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。

[0079] 上記で生成した反応液10μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、バチラス サプチリスdec/BS 遺伝子の場合約2.3-kb 、ラクトバチルス ラムノーサスdec/LR 遺伝子の場合約2.1-kb 、ラクトバチルス プレビスdec/LB 遺伝子の場合約2.0-kb 、シュードモナス プチダdec/PP 遺伝子の場合約0.6-kb 、エシエリキア コリdec/EC 遺伝子の場合約1.6-kb 、サッカロマイセス セレビシエdec/SC 遺伝子の場合約1.7-kb 、エンテロバクター クロアカエdec/ECL 遺伝子の場合約2.3-kb のDNA断片が検出できた。

[0080] (4) アニリン生産遺伝子発現プラスミドの構築

アニリン生産遺伝子のPCRB207へのクローニング

上記項(3)に示したPCRにより増幅したサッカロマイセス セレビシエ株由来dec/SC 遺伝子を含む約1.7-kb のDNA断片10μL及びPgapAプロモーターを含有するクローニングベクターpCRB207 2μLを制限酵素NcoIで切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNAリガーゼ10X緩衝液 1从l 、T4 DNAリガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションE液とした。

得られたライゲーションE液を、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドPCRB207約5.1-kb のDNA断片に加え、サッカロマイセス セレビシエ株由来dec/SC 遺伝子 (ライゲーションE液)の場合、長さ約1.7-kb の挿入断片が認められた。

サッカロマイセス セレビシエ株由来dec/SC 遺伝子を含むプラスミドをpCRB207-dec/SC と命名した (図1) 。

[008 1] アニリン生産遺伝子のPCRB209へのクローニング:

上記項(3)に示したPCRにより増幅したバチラス サブチリス株由来dec/BS 遺伝子を含む約2.3-kb の DNA断片、ラクトバチルス ラムノーサス株由来dec/LR 遺伝子を含む約2.1-kb の DNA断片、ラクトバチルス プレビス株由来dec/LB 遺伝子を含む約2.0-kb の DNA断片、シュードモナス プチダ株由来dec/PP 遺伝子を含む約0.6-kb のDNA断片、エシエリキア コリ株由来dec/EC 遺伝子を含む約1.6-kb の DNA断片、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL 遺伝子を含む約2.3-kb の DNA断片10μL及びPgapAプロモーターを含有するクローニングベクターPCRB209 2μlを各々制限酵素Ndel で切断し、70℃で10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これにT4 DNA リガーゼ10X緩衝液 1μl 、T4 DNA リガーゼ (タカラバイオ株式会社製) 1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10μl にして、15℃で3時間反応させ、結合させた。これをライゲーションF液、G液、H液、I液、J液及びK液とした。

[0082] 得られた6種のライゲーションF液、G液、H液、I液、J液及びK液それぞれを、塩化カルシウム法 [Journa l of Mo Lecu Lar Bio Logy, 53, 159 (1970)〕によりエシエリヒア コリJM109を形質転換し、カナマイシン50μg/mLを含むLB寒天培地 〔1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、および1.5% 寒天〕に塗布した。

各々の培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドPCRB209約5.1-kb のDNA断片に加え、バチラス サブチリス株由来dec/BS 遺伝子 (ライゲーションF液)の場合、長さ約2.3-kb の挿入断片が、ラクトバチルス ラムノーサス株由来dec/LR 遺伝子 (ライゲーションG液)の場合、長さ約2.1-kb の挿入断片が、ラクトバチルス プレビス株由来dec/LB 遺伝子 (ライゲーションH液)の場合、長さ約2.0-kb の挿入断片が、シュードモナス プチダ株由来dec/PP 遺伝子 (ライゲーションI液)の場合、長さ約0.6-kb の挿入断片が、エシエリキア コリ株由来dec/EC 遺伝子 (ライゲーション」液)の場合、長さ約1.6-kb の挿入断片が、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL 遺伝子 (ライゲーションK液)の場合、長さ約2.3-kb の挿入

断片が認められた。

[0083] バチラス サプチリス株由来dec/BS 遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/BS、ラクトバチルス ラムノーサス株由来dec/LR 遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/LR 、ラクトバチルス プレビス株由来dec/LB 遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/LB 、シュードモナス プチダ株由来dec/PP 遺伝子を含むブラスミドをpCRB209-dec/PP 、エシエリキア コリ株由来dec/EC 遺伝子を含むブラスミドをpCRB209-dec/EC 、エンテロバクター クロアカエ株由来dec/ECL 遺伝子を含むプラスミドをpCRB209-dec/ECL とそれぞれ命名した (図1) 。

[0084] (5) アニリン生産遺伝子導入株の構築

上述のプラスミド6種類pCRB209-dec/BS 、pCRB209-dec/LR 、pCRB209-dec/LB 、pCRB209-dec/PP 、pCRB209-dec/EC 、pCRB207-dec/SC 及びpCRB209-dec/ECL を用いて、電気パルス法 [Agric. Biol Chem.、Vol. 54、443-447 (1990) 及び Res. Microbiol、Vol. 144、181-185 (1993)] により、コリネバクテリウム ダルタミカム R 株を形質転換し、カナマイシン 50μg/mLを含むA寒天培地に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出、該プラスミドを制限酵素で切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記で作製のプラスミドpCRB209-dec/BS 、pCRB209-dec/LR 、pCRB209-dec/LB 、pCRB209-dec/PP 、pCRB209-dec/EC 、pCRB207-dec/SC 及びpCRB209-dec/ECL の導入が認められた。

[0085] pCRB209-dec/BS プラスミドを導入した株をコリネバクテリウム ダルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-1、pCRB209-dec/LR プラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-2 、pCRB209-dec/LB プラスミドを導入した株をコリネバクテリウム ダルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-3 、pCRB209-dec/PP プラスミドを導入した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-4 、pCRB209-dec/EC プラスミドを導入した株をコリネバクテリウム ダルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ANI-5、pCRB207-dec/SC プラ

スミドを導入した株をコリネバクテリゥム ダルタミカム (Corynebac terium glutamicum) ANI-6 、pCRB209-dec/ECL プラスミドを導入した株をコリネバクテリゥム グルタミカム (Corynebac terium glutamicum) ANI-7と命名した。

[0086] コリネバクテリゥム グルタミカム (Corynebac terium glutamicum) ANI-1は、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-08 18) の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託した (受託日 :2010年11月16日、受託番号 :NITE BP-1001) 。

[0087] 実施例2 コリネバクテリゥム グルタミカム アニリン生産遺伝子導入株のアントラニル酸からのアニリン生成実験

実施例1において作製したコリネバクテリゥム ダルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50μg/mLを含むA寒天培地[$(NH_2)_2C0$ 2g、$(NH_4)_2S0_4$ 7g、KH_2P0_4 0.5 g、K_2HP0_4 0.5 g、$MgS0_4.7H_20$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2S0_4.7H_20$ + 0.042% (w/v) $MnS0_4.2H_20$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁] に塗布し、33℃、20時間暗所に静置した。

[0088] 上記のプレートで生育したコリネバクテリゥム ダルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50μg/mLを含有したA液体培地10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて20時間、好気的に振盪培養を行った。このようにして培養増殖されたそれぞれの菌体は、遠心分離 (4℃、15,000Xg、10分) により菌体を回収した。得られた菌体を、10 mL のBT液体培地 〔$(NH_2)_2C0$ 2g、$(NH_4)_2S0_4$ 7g、KH_2P0_4 0.5 g、K_2HP0_4 0.5 g、$MgS0_4.7H_20$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4.7H_20$ + 0.042% (w/v) $MnS0_4.2H_20$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL、0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL] で2回洗浄した後、OD_{610}=10となるようにBT液体培地で懸濁した。この菌体懸濁液を容量15mLの遠心管に入れ、還元条件下 (酸化還元電位 ;-450 mV) 、基質としてアントラニル酸を25 mMとなるように添加し、33℃に保った水浴中で攪拌しながら6時間反応させた。サンプリングした反応液を遠心分離 (4℃、15,000Xg、10分) し、得られた上清

液を用いてアニリンをGC/MSによって定量した。

この結果、コリネバクテリウム ダルタミカムANI-1 ~ANI-7 株は、還元条件下における反応において、下記表1のようにアニリンを生成していた。

[0089] [表1]

アントラニル酸を基質とした場合のコリネバクテリウム グルタミカムANI-1 ～ANI-7株のアニリン生成実験

菌株名	宿主株	アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ遺伝子の由来	アニリン生産量(mM)
ANI-1	Corynebacterium glutamicum (野生株)	バチラス サブチリス (Bacillus subtilis)	0.75
ANI-2		ラクトバチルス ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus)	0.7
ANI-3		ラクトバチラス ブレビス (Lactobacillus brevis)	0.6
ANI-4		シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida)	0.6
ANI-5		エシェリキア コリ (Escherichia coli)	0.5
ANI-6		サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	0.5
ANI-7		エンテロバクター クロアカエ (Enterobacter cloacae)	0.5

なお、カナマイシンを培地に添加しないこと以外は上記と同様の実験をコリネバクテリウム ダルタミカム野生株に対して行ったところ、アニリン生成は認められなかった。

[0090] 実施例3 コリネバクテリウム グルタミカム アニリン生産遺伝子導入株の4-アミノベンゾエートからのアニリン生成実験

実施例1において作製したコリネバクテリウム ダルタミカムANI-1 ~ANI-7株を、カナマイシン50μg/mLを含むA寒天培地[$(NH_2)_2C0$ 2g、$(NH_4)_2S0_4$ 7g、KH_2P0_4 0.5 g、K_2HP0_4 0.5 g、$MgS0_4.7H_20$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2S0_4.7H_20$ + 0.042% (w/v) $MnS0_4.2H_20$ 1 mL 0.02% (w/v) biotin solution 1 mL 0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL yeast extract 2 g、vitamin assay casamino acid 7 g、glucose 40 g、寒天 15 gを蒸留水1Lに懸濁] に塗布し、33℃、20

時間暗所に静置した。

[009 1] 上記のプレートで生育したコリネバクテリウム ダルタミカムANI-1~ANI-7株を、カナマイシン50μg/mLを含有したA液体培地10mLの入った試験管に一白金耳植菌し、33℃にて20時間、好気的に振盪培養を行った。このようにして培養増殖されたそれぞれの菌体は、遠心分離(4℃、15,000Xg、10分)により菌体を回収した。得られた菌体を、10 mLのBT液体培地[$(NH_2)_2C0$ 2g、$(NH_4)_2S0_4$ 7g、KH_2P0_4 0.5 g、K_2HP0_4 0.5 g、$MgS0_4.7H_20$ 0.5 g、0.06% (w/v) $Fe_2SO_4.7H_20$ + 0.042% (w/v) $MnS0_4.2H_20$ 1 mし 0.02% (w/v) biotin solution 1 ㎖、0.01% (w/v) thiamin solution 2 mL]で2回洗浄した後、OD_{610}=10となるようにBT液体培地で懸濁した。この菌体懸濁液を容量15mLの遠心管に入れ、還元条件下(酸化還元電位;-450 mV)、基質として4-アミノベンゾエートを5 mMとなるように添加し、33℃に保った水浴中で攪拌しながら6時間反応させた。サンプリングした反応液を遠心分離(4℃、15,000Xg、10分)し、得られた上清液を用いてアニリンをGC/MSによって定量した。

この結果、コリネバクテリウム ダルタミカムANI-1~ANI-7株は、還元条件下における反応において、下記表2のようにアニリンを生成していた。

[0092]

[表2]

4-アミノベンゾエートを基質とした場合のコリネバクテリウム グルタミカム ANI-1-ANI-7株のアニリン生成実験

菌株名	宿主株	アミノベンゾエート デカルボキシラーゼ遺伝子の由来	アニリン生産量 (mM)
ANI-1	Corynebacterium glutamicum (野生株)	バチラス サブチリス (Bacillus subtilis)	0.7
ANI-2		ラクトバチルス ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus)	0.65
ANI-3		ラクトバチラス ブレビス (Lactobacillus brevis)	0.6
ANI-4		シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida)	0.6
ANI-5		エシェリキア コリ (Escherichia coli)	0.5
ANI-6		サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)	0.5
ANI-7		エンテロバクター クロアカエ (Enterobacter cloacae)	1.25

なお、カナマイシンを培地に添加しないこと以外は上記と同様の実験をコリネバクテリウム ダルタミカム野生株に対して行ったところ、アニリン生成は認められなかった。

産業上の利用可能性

[0093] 本発明方法によれば、微生物を用いて実用的な効率でアミノ安息香酸からアニリンを製造することができる。

請求の範囲

[請求項1] アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ(aminobenzoate decarboxylase)活性を有する酵素をコードする遺伝子が、宿主のコリネ型細菌に導入された、アニリン生産能を有する形質転換体。

[請求項2] アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が、バチラス サプチリス(Bacillus subtilis)由来の遺伝子、ラクトバチルス ラムノーサス(Lactobacillus rhamnosus)由来の遺伝子、ラクトバチラス プレビス(Lactobacillus brevis)由来の遺伝子、シュードモナス プチダ(Pseudomonas putida)由来の遺伝子、エシエリキア コリ(Escherichia coli)由来の遺伝子、サッカロマイセス セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)由来の遺伝子、又はエンテロバクター クロアカエ(Enterobacter cloacae)由来の遺伝子である請求項1に記載の形質転換体。

[請求項3] アミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子が下記の(a)又は(b)のDNAである請求項1に記載の形質転換体。

(a) 配列番号16の塩基配列からなるDNA、配列番号19の塩基配列からなるDNA、配列番号22の塩基配列からなるDNA、配列番号25の塩基配列からなるDNA、配列番号28の塩基配列からなるDNA、配列番号31の塩基配列からなるDNA、又は配列番号34の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の何れかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつアミノベンゾエートデカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

[請求項4] 宿主のコリネ型細菌がコリネバクテリウム グルタミカムである請求項1~3の何れかに記載の形質転換体。

[請求項5] 宿主のコリネバクテリウム グルタミカムが、コリネバクテリウム グルタミカムR(FERM P—18976)、ATCC 13032, 又はATCC1 3869である請求項4に記載の形質転換体。

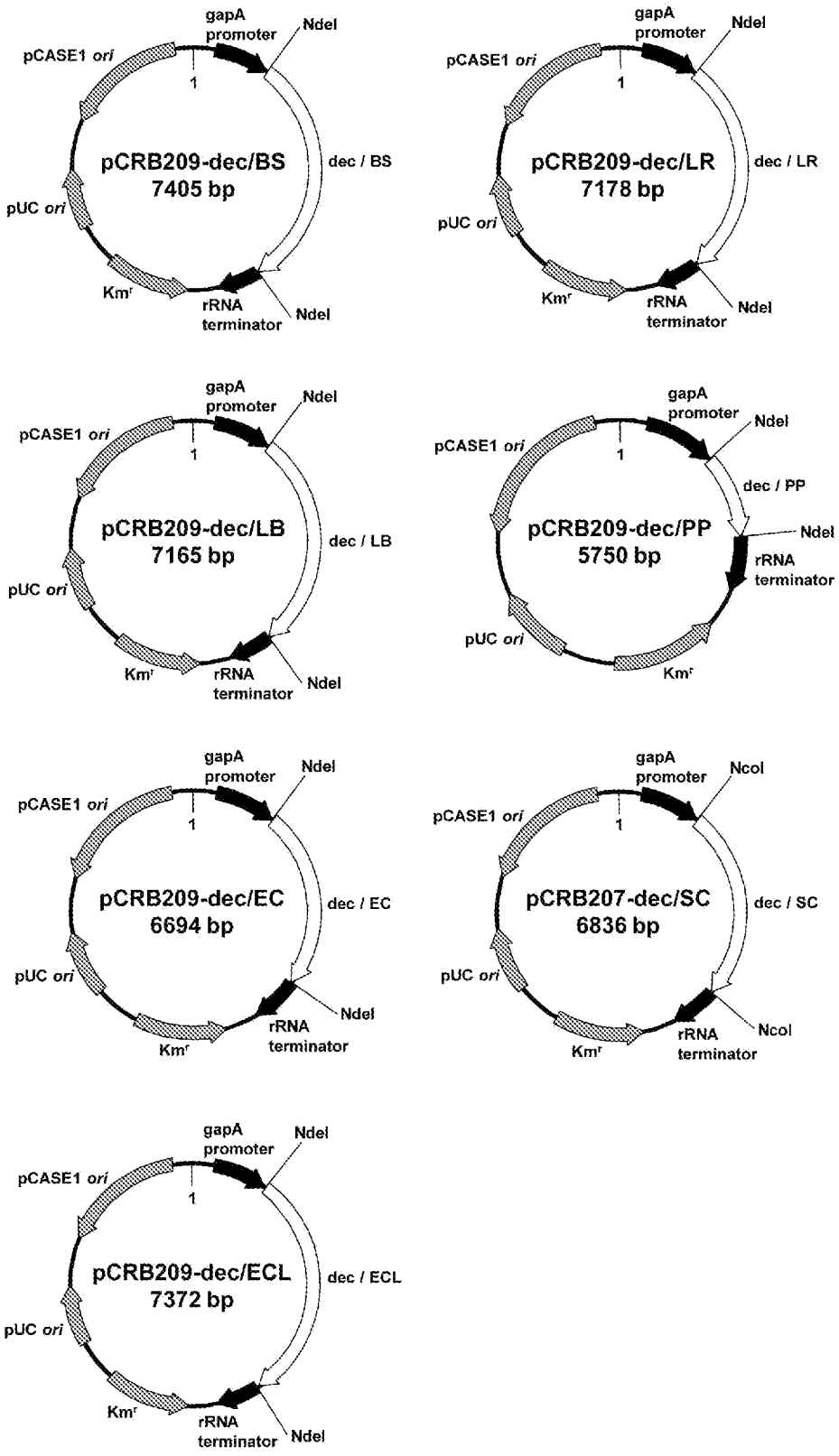
[請求項6] コリネバクテリウム グルタミカム ANI-1 (受託番号 :NITE BP-1 00 1) 形質転換体。

[請求項7] 請求項 1~ 6 の何れかに記載の形質転換体を、還元条件下、アミノ安息香酸、そのエステル、及び/ 又はその塩を含有する反応液中で反応させる工程と、反応培地中のアニリンを回収する工程とを含むアニリンの製造方法。

[請求項8] 反応工程において、形質転換体が実質的に増殖しない請求項 7 に記載のアニリンの製造方法。

[請求項9] 還元条件下の反応液の酸化還元電位が—２００〜– ５００ミリボルトである請求項 7 又は 8 に記載のアニリンの製造方法。

[図1]


gapA promoter
NdeI
pCASE1 ori
1
pCRB209-dec/BS
7405 bp
dec / BS
pUC ori
Km^r
rRNA terminator
NdeI
gapA promoter
NdeI
pCASE1 ori
1
pCRB209-dec/LR
7178 bp
dec / LR
pUC ori
Km^r
rRNA terminator
NdeI
gapA promoter
NdeI
pCASE1 ori
1
pCRB209-dec/LB
7165 bp
dec / LB
pUC ori
Km^r
rRNA terminator
NdeI
gapA promoter
NdeI
pCASE1 ori
1
dec / PP
pCRB209-dec/PP
5750 bp
NdeI
rRNA terminator
pUC ori
Km^r
gapA promoter
NdeI
pCASE1 ori
1
pCRB209-dec/EC
6694 bp
dec / EC
pUC ori
Km^r
NdeI
rRNA terminator
gapA promoter
NcoI
pCASE1 ori
1
pCRB207-dec/SC
6836 bp
dec / SC
pUC ori
Km^r
rRNA terminator
NcoI
gapA promoter
NdeI
pCASE1 ori
1
pCRB209-dec/ECL
7372 bp
dec / ECL
pUC ori
Km^r
rRNA terminator
NdeI

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT / JP2 011 / 080151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1 /21 (2006.01)i, C12P1 3/0 0(2006.01)i, C12N1 5/09 (2006.01)n, C12R1 / 15 (2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N1 / 21, C12P13/ 00, C12N1 5/ 09, C12R1/ 15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1 996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1 971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/ BI○SIS/MEDLINE /WPI DS(STN), JST Plus / JMEDPlus / JST 7580 (JDreaml l), GenBank/EMBL/ DDBJ/ GeneS eq, Uni Prot / GeneS eq, SwissProt/PIR/GeneSeq,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sloane, N. H. et al., Studies on the metabolism of p-aminobenzoic acid by Mycobacterium Smegmatis, Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, 1951, p. 453-458	1-9
A	McCullough, W. G. et al., Enzymatic Decarboxylation of the Aminobenzoates-, Journal of the American Chemical Society, 1957, Vol. 79, p. 628-630	1-9
A	JP 2008-274225 A (Sumitomo Rubber Industries, Ltd.), 13 November 2008 (13.11.2008), examples & US 2008/0242823 A1 & EP 1975240 A1 & DE 602008000176 D & CN 101274996 A & RU 2008111877 A	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 March, 2012 (14.03.12)	27 March, 2012 (27.03.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/080151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Masayuki INOUE, "Synthesis of Bio-Aniline: Reduction of Nitrobenzene by Immobilized Baker's Yeast", Chemical Education, 1991, vol.39, no.5, pages 572 to 573	1-9
A	Stotz, Agathe and Linder, Patrick, The ADE2 gene from Saccharomyces cerevisiae: sequence and new vectors, Gene, 1990, Vol. 95, p. 91-98	1-9
A	Tiedeman, A. A. et al, Nucleotide sequence analysis of the purEK operon encoding 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole carboxylase of Escherichia coli K-12., Journal of Bacteriology, 1989, Vol.171, No. 1, p. 205-212	1-9
A	Kahng, H.-Y. et al., Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline, FEMS Microbiology Letters, 2000, Vol. 190, p. 215-221	1-9
A	NELSON, K. E. et al., Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440., Environmental Microbiology, 2002, Vol. 4, No-12, p.799-808	1-9
A	MATSUI, T. et al, Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of Enterobacter cloacae P240., Archives of Microbiology, Vol. 186, 2006, p. 21-29	1-9
A	Lupa, B. et al., Properties of the reversible nonoxidative vanillate / 4-hydroxybenzoate decarboxylase from Bacillus subtilis., Canadian Journal of Microbiology, 2008, Vol. 54, p.75-81	1-9
P,X	WO 2011/050326 A1 (GENOMATICA, INC.), 28 April 2011 (28.04.2011), a whole article; page 19, line 9; fig. 2 & US 2011/0097767 A1	1-9

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN)

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP2011／080151

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12P13/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12R1/15(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/21, C12P13/00, C12N15/09, C12R1/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922－	年
日本国公開実用新案公報	1971－2	年
日本国実用新案登録公報	1996－	年
日本国登録実用新案公報	1994－2	年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq., UniProt/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	Sloane, N. H. et al., Studies on the metabolism of p-arainobenzoic acid by Mycobacterium Sraegraatis, Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, 1951, p. 453—458	1-9
A	McCullough, W. G. et al., Enzymatic Decarboxylation of the Aminobenzoates., Journal of the American Chemical Society, 1957, Vol. 79, p. 628-630	1-9

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
14.03.2012	27.03.2012

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA／JP)
郵便番号100—8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) 4B 3763
濱田 光浩
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2008-274225 A (住友ゴム工業株式会社) 2008. 11. 13, 実施例 & US 2008/0242823 A1 & EP 1975240 A1 & DE 602008000176 D & CN 101274996 A & RU 2008111877 A	1-9
A	井上正之，バイオ'ァニリンの合成一固定化パン酵母による二トロベンゼンの還元－，化学と教育，1991，Vol. 39，No. 5，p. 572-573	1-9
A	Stotz, Agathe and Linder, Patrick, The ADE2 gene from Saccharomyces cerevisiae : sequence and new vectors, Gene, 1990, Vol. 95, p. 91-98	1-9
A	Tiedeman, A. A. et al, Nucleotide sequence analysis of the purEK operon encoding 5' -phosphor ibosyl-5-araino imidazole carboxylase of Escherichia coli K-12. , Journal of Bacteriology, 1989, Vol. 171, No. 1, p. 205-212	1-9
A	Kahng, H._Y. et al. , Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline, FEMS Microbiology Letters, 2000, Vol. 190, p. 215-221	1-9
A	NELSON, K. E. et al. , Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas put i da KT2440. , Environmental Microbiology, 2002, Vol. 4, No. 12, p. 799-808	1-9
A	MATSUI, T. et al, Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of Enterobacter cloacae P240. , Archives of Microbiology, Vol. 186, 2006, p. 21-29	1-9
A	Lupa, B. et al. , Properties of the reversible nonoxidative vanillate / 4-hydroxybenzoate decarboxylase from Bacillus subtilis. , Canadian Journal of Microbiology, 2008, Vol. 54, p. 75-81	1-9
P. X	Wo 2011/050326 AI (GEN0MATICA, INC.) 2011. 04. 28, 全体、p. 19 第9f-, FIG. 2 & US 2011/0097767 AI	卜9